

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Registering the presence of immobilized substances on a bio-chip carrier, comprises using a fluorescence scanner, where a pulsed laser excites fluorescent markings to be detected between the pulses with local resolution

Veröffentlichungsnr. (Sek.) DE10038080
 Veröffentlichungsdatum : 2002-02-21
 Erfinder : PRIX LOTHAR (DE); LECLERC NORBERT (DE); SCHUETZ ANDREAS (DE); GRILL HANS-JOERG (DE)
 Anmelder : GIESING MICHAEL (DE); SL MICROTEST WISSENSCHAFTLICHE (DE)
 Veröffentlichungsnummer : ☒ DE10038080
 Aktenzeichen:
 (EPIDOS-INPADOC-normiert) DE20001038080 20000804
 Prioritätsaktenzeichen:
 (EPIDOS-INPADOC-normiert) DE20001038080 20000804
 Klassifikationssymbol (IPC) : G01N21/64; G01N33/52; C12Q1/68; C12M1/34
 Klassifikationssymbol (EC) : G01N21/64F
 Korrespondierende Patentschriften

Bibliographische Daten

To show the presence of immobilized substances on a carrier, a series of light pulses are directed at the defined surface under study as an excitation light beam, fluorescent light is detected between successive light pulses, shown by the substances in the measurement field, and the light beams and the carrier are moved in relation to each other until a sufficient surface area has been scanned. To register the presence of immobilized substances on a carrier, fluorescent light is detected by time resolution by a time-correlated count of the separate photons. The fluorescent light is detected by a confocal action where the excitation light is focused on to the carrier surface, or by wavelength-related means. The measurement field defined by the excitation light on the carrier has a diameter of 1 - 20 micro m full width half maximum (FWHM). The carrier supports the immobilized substances in a two-dimensional pattern. The light beam and the carrier are moved in relation to each other so that the elements of the two-dimensional pattern are given a sequential scanning. The carrier surface is scanned by deflection of the excitation light beam and by sliding the carrier on a plane parallel to its surface. The excitation light beam has one or more defined wavelengths. A control sets the relative positions between the carrier and the excitation light beam. An Independent claim is included for a fluorescence scanner (10) to detect immobilized substances, on a carrier, with a light source to deliver a series of pulses of an excitation light at a defined measurement field on the bio-chip (15) carrier, where a system (25) detects fluorescent light from the illuminated substances between the pulses, a system gives a timed correlation between the light and detection units, and a control (30) determines the relative positions between the carrier and the light.

Daten aus der **esp@cenet** Datenbank - - I2



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 38 080 A 1

51 Int. Cl. 7:
G 01 N 21/64
G 01 N 33/52
C 12 Q 1/68
C 12 M 1/34

21 Aktenzeichen: 100 38 080.8
22 Anmeldetag: 4. 8. 2000
43 Offenlegungstag: 21. 2. 2002

DE 100 38 080 A 1

71 Anmelder:
Giesing, Michael, Prof. Dr.med., 45659
Recklinghausen, DE; SL Microtest
wissenschaftliche Geräte GmbH, 07745 Jena, DE
74 Vertreter:
Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

72 Erfinder:
Leclerc, Norbert, Dr., 07743 Jena, DE; Grill,
Hans-Jörg, Dr., 45659 Recklinghausen, DE; Schütz,
Andreas, Dr., 45739 Oer-Erkenschwick, DE; Prix,
Lothar, Dr., 45663 Recklinghausen, DE

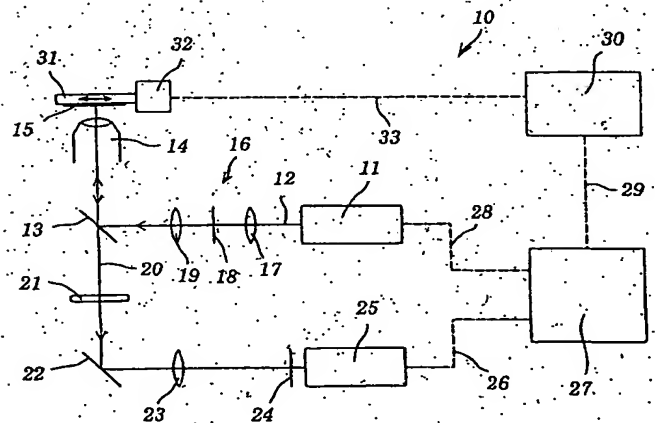
56 Entgegenhaltungen:
DE 198 02 378 C2
DE 36 14 359 C2
DE 198 01 139 A1
DE 197 18 016 A1
DE 42 10 970 A1
DE 27 47 409 A1
DE 26 08 158 A1
US 59 81 956 A
WO 94 18 547 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Vorrichtung zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines Biochips immobilisierten Substanzen. Die Erfindung betrifft insbesondere einen Fluoreszenzscanner 10 mit einem Puls laser 11, der einen Anregungslichtstrahl 12 aussendet, welcher auf die Oberfläche eines Biochips 15 fokussiert wird. Die Oberfläche des Biochips 15 wird abgetastet und das von der Oberfläche emittierte Fluoreszenzlicht mittels eines Detektors 25 orts aufgelöst gemessen. Durch zeitliche Korrelation der einzelnen Anregungsimpulse und der entsprechenden Fluoreszenzlichtimpulse kann das detektierte Fluoreszenzsignal effektiv von Reflexionen der Oberfläche des Biochips und/oder von Streulichtanteilen separiert werden. Damit können sehr schwache Fluoreszenzsignale mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung gemessen werden.



DE 100 38 080 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen.

[0002] Das Erkennen bestimmter genetischer Informationen ist eine elementare molekularbiologische Aufgabenstellung, zu deren Lösung bereits eine große Zahl unterschiedlichster Methoden vorgeschlagen wurde. Kann eine gesuchte genetische Information auf bestimmte Nukleinsäuresequenzen (im folgenden als Targetsequenzen oder Targets bezeichnet) zurückgeführt werden, benutzt man in vielen Fällen sogenannte Oligonukleotidsonden, deren Nukleinsäuresequenzen zu den Targetsequenzen komplementär sind. Aufgrund ihrer Komplementarität können die Oligonukleotidsonden und die Targetsequenzen spezifisch hybridisieren, so daß man die gesuchten Targetsequenzen in einem Pool umfangreicher und komplexer genetischer Informationen identifizieren und qualitativ und/oder quantitativ analysieren kann.

[0003] Klassische Anwendungen dieser Art sind Northern- und Southern-Blots, sowie die in-situ Hybridisierung. Dazu werden die Proben in der Regel zweckgerecht vorbereitet und mit Hilfe definierter Oligonukleotidsonden untersucht. Bei herkömmlichen Anwendungen dieser Art sind üblicherweise die Oligonukleotidsonden markiert und können so, abhängig von der gewählten Markierung, detektiert werden. Dies ist erforderlich, um probengebundene Sonden, d. h. Sonden, die spezifisch an Targetsequenzen hybridisiert haben, erkennen zu können. Zur Markierung von Oligonukleotidsonden stehen dem Fachmann verschiedenste Methoden zur Verfügung.

[0004] Zur Markierung der Sonden werden Substanzen, sog. Marker, eingesetzt, die mit Hilfe geeigneter Nachweismethoden identifiziert werden können. Weit verbreitet sind insbesondere radioaktive Marker, Bio- oder Chemilumineszenzmarker, sowie Fluoreszenzmarker.

[0005] Dabei haben insbesondere Fluoreszenzmethoden in der chemischen und biologischen Analytik und Diagnostik einen hohen Stellenwert. Es handelt sich dabei um eine sehr nachweisstarke Methode, die ohne Radioaktivität und, falls erforderlich, ohne toxische Substanzen auskommt. Die als Marker verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind verglichen mit Radioisotopen bei entsprechender Lagerung praktisch unbegrenzt haltbar. Es existieren heute empfindliche Detektionssysteme, die schon den Nachweis einzelner fluoreszierender Moleküle ermöglichen. Außerdem existiert eine Vielfalt unterschiedlichster Fluoreszenzfarbstoffe, so daß für die meisten Wellenlängenbereiche im sichtbaren Spektrum, aber auch im angrenzenden ultravioletten und infraroten Spektralbereich auf geeignete Fluoreszenzmarker zurückgegriffen werden kann. Häufig können bei einer Messung sogar mehrere Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Anregungs- und/oder Emissionswellenlängen parallel verwendet werden.

[0006] Gegenüber den als Chemilumineszenzsonden eingesetzten Enzymmarkern haben Fluoreszenzfarbstoffe den Vorteil, daß die Messung direkt nach Einführung des Markers erfolgen kann. Enzym- oder Proteinmarker (beispielsweise der häufig eingesetzte Biotin/Streptavidin-Komplex) benötigen dagegen einen weiteren Inkubationsschritt, in welchem der Enzymmarker eingeführt und die Substratlösung zugegeben wird.

[0007] Bei den oben erwähnten klassischen Hybridisierungsmethoden ist die Zahl der unterschiedlichen Sonden, die in Verbindung mit ein und derselben Probe eingesetzt werden können, begrenzt. Um die Sonden nämlich unter-

scheiden zu können, sind unterschiedliche, d. h. nicht interferierende Markierungen und in der Folge auch unterschiedliche Detektionssysteme erforderlich. Der damit verbundene Aufwand stößt spätestens bei Multi-Parameter-Analysen an die Grenzen der Praktikabilität.

[0008] Entscheidende Vorteile bieten in dieser Hinsicht Testanordnungen mit immobilisierten Oligonukleotidsonden, d. h. Sonden, die an einen festen Träger fixiert sind. Um bei derartigen Systemen eine Bindung von Probe und Sonde erkennen zu können, wird in diesen Fällen meist die Probe und nicht die Sonde markiert. Unter einem festen Träger versteht man dabei ein Material mit starrer oder halbstarrer Oberfläche. Bei derartigen Trägern kann es sich beispielsweise um Partikel, Stränge, insbesondere Faserbündel, sphärische Körper, wie Kugeln oder Kügelchen (sogenannte "beads"), Fällungsprodukte, Gele, Blätter, Röhren, Behälter, Kapillarröhrchen, Scheiben, Folien oder Platten handeln. Am weitesten verbreitet sind inzwischen jedoch planare, d. h. ebene Träger.

[0009] Soll eine Probe mittels mehrerer Sonden mit unterschiedlicher Spezifität untersucht werden, so werden diese Sonden üblicherweise auf einem gemeinsamen Träger so angeordnet, daß jede Sondenart, also beispielsweise eine bestimmte Oligonukleotidsonde mit bekannter Sequenz, einem bestimmten Feld eines zweidimensionalen Feldmusters (allgemein als "Array" bezeichnet) auf dem Träger zugeordnet wird. Die Feststellung, ob und/oder gegebenenfalls in welchem Maße die markierte Probe an ein bestimmtes Feld bindet, erlaubt Rückschlüsse auf die zur Sonde dieses Feldes komplementäre Targetsequenz der Probe und gegebenenfalls auf deren Konzentration.

[0010] Durch fortschreitende Miniaturisierung konnten die Felder mittlerweile wesentlich verkleinert werden, so daß man heute eine Vielzahl verfahrens- und meßtechnisch unterscheidbare Felder, also auch eine Vielzahl unterscheidbarer Sonden auf einem einzelnen Träger anordnen kann. Obwohl Glasträger im molekularbiologischen Bereich für diese Zwecke noch am weitesten verbreitet sind, werden die planaren Träger in Anlehnung an die Halbleitertechnologie auch als "Chips", insbesondere als Biochips, Genchips usw. bezeichnet. Die Sonden können in sehr hoher Dichte an den Träger gebunden und mehrere Sonden einer Sondenart in einem miniaturisierten Feld angeordnet werden. Heute können bereits Chips mit bis zu 40.000 unterschiedlichen molekularen Sonden pro cm^2 hergestellt werden.

[0011] Vor allem hat die Anwendung photolithographischer Fabrikationstechniken aus der Halbleitertechnologie zu entscheidenden Fortschritten bei der Herstellung solcher Chips geführt. Das Prinzip basiert auf einer lichtgesteuerten chemischen Festphasensynthese, bei der photolithographische Masken die Felder abbilden (vgl. beispielsweise Fodor et al. "Lightdirected, spatially addressable parallel chemical synthesis", Science, vol. 251, 767-773 (1991)). Dieses Verfahren ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Sonden auf dem Träger in-situ aus einzelnen Bausteinen, beispielsweise Nukleotiden, aufgebaut werden sollen. So kann ein bestimmter Baustein gezielt an die im Aufbau befindlichen Sonden bestimmter Felder angefügt werden, während die Sonden der übrigen Felder unberührt bleiben. Dies gelingt mit photolithographischen Masken, die Licht zur lichtgesteuerten chemischen Synthese nur auf diejenigen Felder abbilden, an die der Baustein angefügt werden soll. Beispielsweise kann der Lichteinfall die Abspaltung lichtempfindlicher Schutzgruppen bewirken, wodurch eine reaktive Gruppe genau an derjenigen Stelle der im Aufbau befindlichen Sonden freigesetzt wird, an die der Baustein angefügt werden soll. Da ein zuletzt angefügter Baustein in der Regel eine gebundene Schutzgruppe einbringt und dadurch die um-

einen Baustein erweiterten Sonden wieder schützt, wird an eine aktivierte Sonde lediglich ein einziger Baustein angefügt. Aus dem gleichen Grund stehen die während eines Zyklus um einen Baustein erweiterten Sonden gleichermaßen wie die in diesem Zyklus nicht erweiterten Sonden als zunächst geschützte Gesamtheit aller Sonden einer neuen gezielten Aktivierung durch eine passende Maske für die Anfügung eines weiteren Baustein in einem neuen Zyklus zur Verfügung. Derartige Verfahren werden ausführlich in den internationalen Patentanmeldungen WO 90/15070, WO 91/07087, WO 92/10092, WO 92/10587, WO 92/10588 und in dem U.S.-Patent 5,143,854 beschrieben. Ein anderes in-situ Verfahren zur Herstellung von sog. DNA Microarrays, das von der Firma Rosetta Inpharmatics, Inc., unter der Bezeichnung FlexJet angeboten wird, basiert auf geeigneten Modifikationen des Druckprozesses von Farb-Tintenstrahl Druckern.

[0012] Andere Chips weisen wiederum Sonden auf, die nicht in-situ synthetisiert, sondern in vorgefertigter Form auf den Träger aufgebracht werden. Entsprechende Arrays aus Biomolekülen zur Sequenzanalyse von Polynukleotiden wurden bereits von E. Southern in der internationalen Patentanmeldung WO 89/10977 beschrieben. Biomolekulare Arrays eignen sich für eine Vielzahl von Anwendungen, angefangen von der Sequenzierung von DNA über das DNA-Fingerprinting bis zu Anwendungen in der medizinischen Diagnostik. Inzwischen werden schon kommerzielle Biochips mit einer Vielzahl verschiedener cDNAs zur Hybridisierung angeboten. Bei diesen cDNAs handelt es sich beispielsweise um Nukleinsäuresequenzen mit Längen von etwa 200 bis 600 Basenpaaren (bp), die mittels genspezifischer Primer amplifiziert werden, deren Identität durch Teilsequenzierung überprüft wird und die dann gezielt an bekannten Plätzen beispielsweise auf einer Nylonmembran angebracht werden.

[0013] Werden die fluoreszenzmarkierten Proben mit auf einem planaren Chip immobilisierten Sonden in Kontakt gebracht, kann es auf einzelnen Feldern zu einer Kopplung, beispielsweise einer Hybridisierung, mit komplementären Sonden kommen. In Fällen, in denen eine Fluoreszenzmarkierung der Proben nicht zweckmäßig ist, kann auch nach Bindung der Proben an die Sonden der Chip mit geeigneten fluoreszenzmarkierten Rezeptoren in Kontakt gebracht werden. In beiden Fällen werden Fluoreszenzfarbstoffe auf denjenigen Feldelementen immobilisiert, an denen eine Bindung zwischen Sonden und Proben stattgefunden hat. Wird der Chip dann mit Licht einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt, so werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und Licht wird emittiert. Das resultierende Muster aus hellen und dunklen Feldelementen auf dem planaren Träger wird aufgezeichnet. Informationen über die Probe kann man also dadurch erhalten, daß man das Hell/Dunkel-Muster mit dem bekannten Muster der an die Trägeroberfläche fixierten biologischen Sonden vergleicht.

[0014] Die fortschreitende Miniaturisierung hat zu einer großen Anzahl von Feldelementen auf einem einzelnen planaren Träger geführt, die bei kommerziellen Anwendungen in kurzer Zeit sehr zuverlässig vermessen werden müssen. Zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen werden heute hauptsächlich Laser eingesetzt, bei denen die Feldelemente durch einen intensiven Laserstrahl mit geringem Durchmesser abgetastet werden. Ein entsprechender Fluoreszenzscanner wird von der Firma Hewlett-Packard für die Auswertung von Biochips der Firma Affymetrix hergestellt und ist in den U.S.-Patenten 5,837,475 und 5,945,679 detaillierter beschrieben. Er arbeitet bei einer Wellenlänge von 488 nm und die kleinsten meß-

baren Strukturen liegen im Bereich von 20 µm. Der Scanner wird zur Auswertung von Chips bei der Expressionsanalyse (Rattengenom U34), zum Genotyping (HuSNP) und zur Krankheitsüberwachung (Krebs, CYP450, p53, HIV) eingesetzt. Die entsprechenden kommerziell erhältlichen Chips erlauben aber keine Qualitätskontrolle, d. h. die Aussage über die Richtigkeit der Meßergebnisse muß vom Nutzer anhand einer Plausibilitätsbetrachtung durchgeführt werden. Eine Quantifizierung ist nicht vorgesehen. Die Chips zeichnen sich aber durch eine sehr hohe Informationsdichte von bis zu 40.000 Oligonukleotiden/cm² aus. Als Träger dienen modifizierte Glasoberflächen.

[0015] Neben der Ortsauflösung ist es insbesondere wichtig, das Fluoreszenzlicht möglichst effektiv zum Detektor zu leiten und Hintergrundsignale und Streulicht weitgehend auszublenden. Dazu werden bereits sogenannte Laserscanner mit konfokaler Optik verwendet, die mit konfokalen Blenden, sog. "Pinholes", im Detektions- und gegebenenfalls auch im Anregungsstrahlengang ausgerüstet sind. Als Anregungslichtquelle werden üblicherweise Laser und als Detektoren Photomultiplier oder empfindliche Dioden eingesetzt. Laser ermöglichen wegen ihrer hohen lokalen Anregungsenergie sehr kurze Meßzeiten und sind daher die bevorzugten Anregungslichtquellen. Durch die konfokale Optik ist gewährleistet, daß lediglich Fluoreszenzlicht aus der Ebene der Chipoberfläche zum Photomultiplier gelangt, während Fluoreszenz- oder Streulicht aus darüber oder darunter liegenden Ebenen durch die Pinholes ausgeblendet wird. So wird beispielsweise in De Saizieu, A. et al. "Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays", Nature Biotechnology 16, 45-48 (1998) ein System zur Transkriptionskontrolle von Bakterien (Hemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae) beschrieben, bei dem zur Fluoreszenzanalyse ein konfokales Mikroskop verwendet wird.

[0016] Das Abtasten (Scannen) der Probe kann auf unterschiedliche Weise erfolgen: Entweder über das Anregungs- und Detektionssystem bei feststehendem planaren Träger, beispielsweise durch Ablenken des Anregungsstrahls, oder der planare Träger wird bei feststehendem Anregungs- und Detektionssystem bewegt. Auch kombinierte Verfahren sind möglich. So kann man beispielsweise den planaren Träger in einer Richtung und den Anregungslaserstrahl in einer dazu senkrechten Richtung bewegen, um die Trägeroberfläche zweidimensional abzutasten.

[0017] Eine weitere Möglichkeit stellen zweidimensionale Detektoren, wie beispielsweise CCD-Kameras dar, die in einzelnen Meßvorgängen ein zweidimensionales Bild der Probe erzeugen. Ein Abtasten ist dabei nicht notwendig. In diesen Fällen können ebenfalls Laser, aber auch Lampen mit entsprechenden Filtern als Anregungsquelle verwendet werden. Da das Bild in einem Schritt aufgenommen wird, kann man bei diesen Methoden lange Meßzeiten in Kauf nehmen, die bei einem scannenden Meßprozeß aufgrund der sequentiellen Datenaufnahme nicht toleriert werden können. In Guschin, D. et al. "Manual Manufacturing of Oligonucleotide, DNA and Protein Microchips", Anal. Biochem. 250, 203-211 (1997) wird ein Biochip beschrieben, bei dem DNA oder Proteine auf winzigen Gelpads immobilisiert werden, die zuvor auf einen Glasträger aufgebracht wurden. Bis zu 10.000 dieser Pads befinden sich auf einem einzigen Träger. Das System wird eingesetzt, um die schnelle Identifizierung von Tuberkuloseerregern zu ermöglichen und so Stämme die gegen bestimmte Antibiotika resistent sind zu identifizieren. Dazu werden Fluoreszenzmarker wie Fluorescein oder Texas Red verwendet, die mit einem speziellen Mehrfarben-Epifluoreszenzmikroskop mit einem 4 × 4 mm Bildfeld detektiert werden.

[0018] Die bekannten Fluoreszenzdetektionssysteme für Biochips weisen jedoch Nachteile auf. Gerade bei hochminiaturisierten Biochips, die sich durch eine große Anzahl Feldelementen von einigen 10 µm Durchmesser auszeichnen, ist eine hohe Sensitivität und Ortsauflösung bei der Fluoreszenzmessung erforderlich. Dies ist mit herkömmlichen Systemen nur begrenzt möglich, da sich beispielsweise Streulicht, das durch Ramanverschiebung bei längeren Wellenlängen als das einfallende Anregungslicht auftritt, mit herkömmlichen Filteranordnungen nicht oder nur unzureichend von dem zu messenden Fluoreszenzlicht unterscheiden werden kann. Sind die fluoreszenzoptisch nachzuweisenden Substanzen auf metallischen oder metallisierten Trägern (z. B. Gold) immobilisiert, so können zudem starke Reflexionen des Anregungslichtes auftreten, die von dem im Detektionssystem angeordneten Filtereinheiten nicht vollständig ausgefiltert werden können.

[0019] Die maximal erreichbare Sensitivität ist daher durch einen Hintergrund an gestreutem oder reflektiertem Anregungslicht und durch unspezifische Fluoreszenzstrahlung, beispielsweise aus einer über dem planaren Träger befindlichen Flüssigkeit begrenzt.

[0020] Der vorliegenden Erfindung liegt daher das technische Problem zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen bereitzustellen, die bei Gewährleistung einer hohen Ortsauflösung den unspezifischen Strahlungshintergrund weitgehend eliminiert. Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung sollen sich insbesondere zur Auswertung von Biochips eignen.

[0021] Gelöst wird dieses Problem durch Bereitstellung des Verfahrens gemäß Anspruch 1, sowie der Vorrichtung gemäß Anspruch 13.

[0022] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demnach ein Verfahren zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen, wobei man einen Anregungslichtstrahl in Form einer Serie von kurzen Lichtimpulsen auf einen Meßbereich mit definierter Größe auf der Oberfläche des Trägers einstrahlt und jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtimpulsen Fluoreszenzlicht detektiert, das von in dem Meßbereich befindlichen immobilisierten Substanzen ausgestrahlt wird und den Anregungslichtstrahl und den Träger relativ zueinander bewegt, bis ein bestimmtes (ein- oder zweidimensionales) Areal der Oberfläche des Trägers abgetastet ist. Das Abtasten und die Fluoreszenzmessung können sequentiell erfolgen, so daß man nach der Messung eines Meßbereichs den Anregungsstrahl auf einer anderen Stelle des planaren Trägers positioniert. Diese Stelle wird dann ebenfalls durch Einstrahlen einer Serie von kurzen Lichtimpulsen und Detektion der zwischen den Lichtimpulsen emittierten Fluoreszenzstrahlung vermessen.

[0023] Bevorzugt wird jedoch gleichzeitig abgetastet und gemessen. Werden beispielsweise Träger und Anregungsstrahl mit einer Relativgeschwindigkeit von 1 mm/s gegeneinander bewegt, so entspricht ein Meßintervall von 1 ms einer Ortsauflösung von 1 µm. Bei Verwendung eines Lasers mit einer typischen Pulsfrequenz von 50 MHz können innerhalb eines Meßintervalls 50.000 Einzelmessung durchgeführt und aufintegriert werden.

[0024] Wenn man sowohl die Relativposition von Anregungslichtstrahl und Träger zueinander, wie auch die in der jeweiligen Position gemessene Fluoreszenzintensität registriert, digitalisiert und in einem Computer speichert, kann man die gemessenen Fluoreszenzintensitäten beispielsweise auf einem Display als zweidimensionales Bild der Träger-

oberfläche graphisch darstellen.

[0025] Unter immobilisierten Substanzen sind im vorliegenden Zusammenhang insbesondere die üblicherweise auf Biochips oder Genchips immobilisierten biologischen Sonden, beispielsweise Oligonukleotid-Sonden, zu verstehen. Bei Immunoassays kann man beispielsweise die an der Oberfläche des Trägers fixierten biologischen Sonden markieren, um z. B. Aussagen über die Gesamtzahl möglicher Bindungsplätze für mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper machen zu können. Aus dem Verhältnis von Fluoreszenzstrahlung der fixierten Bindungsstellen zur Fluoreszenzstrahlung der gebundenen Antikörper kann man dann Aussagen über die Besetzungsdichte der Bindungsstellen machen.

[0026] Üblicherweise sind jedoch die Proben fluoreszenzmarkiert, so daß der Begriff "immobilisierte Substanzen" im vorliegenden Zusammenhang auch die an die Sonden, beispielsweise durch Hybridisierung, gebundenen Proben bzw. den Komplex aus fixierten Sonden und daran gebundene Proben umfasst. Dabei bedeutet "fluoreszenzmarkierte Probe" nicht notwendigerweise, daß die Probe selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, sondern bedeutet ganz allgemein, daß eine Bindung der Probe an die an der Oberfläche fixierte Sonde zu einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Gesamtkomplexes aus Sonde und daran gebundener Probe führt. Beispielsweise kann eine Bindung einer entsprechend markierten Probe an eine Sonde auch dazu führen, daß Fluoreszenzlicht, welches von einer unbesetzten Sonde emittiert wird, durch Binden eines Probenmoleküls gequenchet wird.

[0027] Ein wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß Anregungslicht nicht kontinuierlich, sondern in Form von kurzen Lichtimpulsen emittiert wird. Entsprechend wird auch das Fluoreszenzlicht in Form kurzer Lichtimpulse emittiert. Erfindungsgemäß wird nun vorgeschlagen, das Fluoreszenzlicht nicht kontinuierlich, sondern zeitlich korreliert jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtimpulsen zu detektieren. Beispielsweise kann die gepulste Anregungslichtquelle mit den Lichtimpulsen korrelierte Triggersignale zum Detektor senden. Jedes Triggersignal erzeugt ein zum Triggersignal zeitlich verzögertes Meßintervall ("Gate") in welchem Fluoreszenzlicht detektiert wird. Durch eine Zeitverzögerung zwischen Triggersignal und Meßintervall die etwa in der Größenordnung der Dauer des Anregungspulses liegt, ist es möglich, Anregungslicht und Fluoreszenzlicht nicht nur spektral mit Hilfe von geeigneten Filtern, sondern auch zeitlich zu unterscheiden. Dies erlaubt insbesondere ramanverschobenes Streulicht und starke, durch die Filter nicht vollständige blockierte Reflexionen vom eigentlichen Fluoreszenzsignal zu trennen. Die Dauer des Anregungslichtimpulses sollte kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer der Fluoreszenzmarker sein, so daß zu Beginn des Meßintervalls noch ein möglichst hohes Fluoreszenzsignal vorhanden ist. Typischerweise hat der Anregungslichtimpuls eine Dauer von 1 ns oder weniger. Bevor der nächste Anregungslichtimpuls ausgesandt wird, ist das Meßintervall beendet. Zur Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses kann man das zwischen den Lichtimpulsen detektierte Fluoreszenzlicht digitalisieren und aufintegrieren.

[0028] Bevorzugt wird man auch bei dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignete Filteranordnungen zur Ausblendung des Anregungslichtes, beispielsweise Langpaßfilter, im Detektionssystem anordnen. Ebenso können im Anregungssystem schmalbandige Filter vorgesehen sein, die lediglich Licht der gewünschten Anregungswellenlänge hindurchlassen. Durch die Kombination spezieller Filter mit der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion erreicht man ein

sehr niedriges Niveau an Hintergrundstrahlung und eine entsprechend hohe Sensitivität der Fluoreszenzmessung.

[0029] Vorteilhaft wird man das Fluoreszenzlicht zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtimpulsen zeitaufgelöst detektieren. So kann man nicht nur die Gesamtintensität der zwischen zwei Lichtimpulsen emittierten Fluoreszenzstrahlung messen, sondern erhält aus dem Abklingverhalten der Fluoreszenzstrahlung zusätzliche Informationen. Beispielsweise kann man durch Auswertung der Abklingkonstante (als im wesentlichen der Fluoreszenzlebensdauer) verifizieren, daß die detektierte Fluoreszenzstrahlung tatsächlich von einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff emittiert wird. Ebenso kann man aus Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer Informationen über die molekulare Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffs erhalten. Wenn zwei oder mehr Fluoreszenzfarbstoffe simultan detektiert werden, macht sich dies auch in einer Änderung des Fluoreszenzabklingverhaltens bemerkbar. Mit kommerziell erhältlichen numerischen Fit-Verfahren lassen sich die Abklingkurven von zwei oder mehr Farbstoffen an ein gemessenes Fluoreszenzsignal anpassen, so daß man beispielsweise auch ohne spektroskopische Detektionsverfahren Aussagen über die Anteile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe machen kann.

[0030] Besonders bevorzugt wird man das Fluoreszenzlicht durch zeitkorreliertes Zählen einzelner Photonen, beispielsweise mit Hilfe eines Photomultipliers oder eines "Single Photon Avalanche Detectors" registrieren. Die jeweils zwischen einzelnen Lichtimpulsen detektierten Signale können beispielsweise mit Hilfe eines Boxcar-Averagers integriert werden.

[0031] Besonders bevorzugt wird man das Fluoreszenzlicht konfokal detektieren. Dabei wird eine konfokale Blende im Detektionsstrahlengang mit Hilfe eines optischen Abbildungssystems auf den vom Anregungslichtstrahl beleuchteten Meßbereich abgebildet. Die konfokale Blende ist im wesentlichen ein Pinhole mit sehr geringem Durchmesser, so daß Fluoreszenzlicht, welches nicht exakt aus der Ebene des Meßbereiches stammt, ausgeblendet wird. Bevorzugt wird man auch den Anregungslichtstrahl konfokal auf die Oberfläche des Trägers fokussieren. Durch die Kombination von konfokalem Prinzip mit der Zeitauflösung gewährleistet das erfindungsgemäße Verfahren eine besonders hohe Empfindlichkeit bei gleichzeitig hoher räumlicher Auflösung. Diese hohe Sensitivität und Ortsauflösung wird auch bei Messungen auf reflektierten Oberflächen, wie Metalloberflächen, aufrechterhalten.

[0032] Durch die hohe erreichbare Auflösung und die hohe Empfindlichkeit können kleinere Feldelemente (Spots) in größerer Dichte auf die Oberfläche des planaren Trägers aufgebracht werden. Aufgrund des konfokalen Meßprinzips können auch dreidimensionale Strukturen durch Veränderung des Fokus abgetastet und rechnerisch ausgewertet werden. Da bei konfokaler Messung und zeitaufgelöster Fluoreszenzdetektion Fluoreszenzlicht lediglich aus einem sehr kleinen Raumbereich detektiert wird, eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Kontrolle der verwendeten Trägermaterialien, Beschichtungen und Reagenzien in Bezug auf Eigenfluoreszenz und Reinheit. Außerdem läßt sich das System als selbstfokussierende Anregungs- und Detektionsoptik ausbilden, so daß beim Abtasten eines planaren Trägers etwaige Unebenheiten oder eine nicht vollkommen horizontale Ausrichtung des Trägers automatisch korrigiert werden können. Da in der eigentlichen Messung Fluoreszenzlicht aus den den Träger bedeckenden flüssigen Reagenzien effektiv ausgeblendet werden kann, sind mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Messungen unmittelbar nach oder sogar während der Hybridisierung möglich, ohne daß vor der Messung Waschschriffe durchgeführt werden

müssen.

[0033] Bevorzugt weist der durch den fokussierten Anregungslichtstrahl definierte Meßbereich auf der Oberfläche des Trägers einen Durchmesser von 1 bis 20 $\mu\text{m}_{\text{FWHM}}$ (Full Width Half Maximum) auf. Zur Erzeugung von derart kleinen Meßspots sind Laser aufgrund der hohen Parallelität ihrer Strahlung besonders gut geeignet.

[0034] Das erfindungsgemäße Verfahren ist für die Messung von Biochips optimiert, so daß man bevorzugt einen Träger verwendet, auf dem die immobilisierten Substanzen in Form eines zweidimensionalen Musters angeordnet sind, wobei man den Anregungslichtstrahl und/oder den Träger so relativ zueinander bewegt, daß die Elemente des zweidimensionalen Musters sequentiell abgetastet werden. So kann man beispielsweise die Oberfläche des Trägers durch Ablenken des Anregungslichtstrahls abtasten und/oder durch Verschieben des Trägers in einer zu der Oberfläche parallelen Ebene. Man kann außerdem durch Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe "mehrdimensionale" Messungen durchführen. Beispielsweise kann man Fluoreszenzfarbstoffe einsetzen, die im Bereich der Anregungslichtwellenlänge überlappende Absorptionsbanden aufweisen, aber bei unterscheidbaren Wellenlängen fluoreszieren. Durch Verwendung geeigneter Filter und/oder dichroitischer Strahlteiler im Detektionssystem lassen sich dann die Fluoreszenzsignale unterscheiden. Auch eine spektral aufgelöste Detektion des Fluoreszenzsignals ist möglich. Die Messung kann prinzipiell mit Anregungslicht einer definierten Wellenlänge durchgeführt werden. Bei Verwendung von mehreren unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern wird man jedoch bevorzugt Anregungslicht mit mehreren definierten Wellenlängen einstrahlen, die an das Absorptionsverhalten der verwendeten Farbstoffe angepaßt sind. "Mehrdimensionale Messungen" sind auch möglich, wenn man, wie oben erwähnt, Farbstoffe mit unterschiedlichem Abklingverhalten einsetzt. Selbstverständlich sind auch Kombinationen aus diesen Meßprinzipien möglich.

[0035] Prinzipiell können alle Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die kovalent, adsorptiv oder durch andere Wechselwirkungen mit der zu markierenden Substanz gekoppelt werden können. In der Praxis ist man lediglich durch die Stabilität des Farbstoffes und die verfügbaren Anregungslaserlichtquellen begrenzt. Auch interkalierende Farbstoffe oder Farbstoffe die spontan an DNA oder Proteine binden wie PicoGreen, SYTO 61 oder Ethidiumbromid sind einsetzbar, des weiteren Lanthanoidkomplexe, Quantendots oder Micellen. Bevorzugte bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Farbstoffe sind Cy2, FITC, Eosin, BCECF, Haematoporphyrin, Acridine Red, Texas red, Cy3, Cy5, Ultralite und Cy7.

[0036] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Vorrichtung zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen mit Anregungsmitteln zum Einstrahlen eines Anregungslichtstrahls in Form einer Serie von kurzen Lichtimpulsen auf einen definierten Meßbereich auf der Oberfläche des Trägers, Detektionsmitteln zum zeitaufgelösten Detektieren von aus dem Meßbereich emittierten Fluoreszenzlicht zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtimpulsen, Mitteln zur zeitlichen Korrelation der Anregungs- und Detektionsmittel, und Steuerungsmitteln zur Steuerung der Relativposition von Anregungslichtstrahl und Träger.

[0037] Vorteilhaft umfassen die Anregungsmittel wenigstens einen gepulsten Laser. Die Steuerungseinheit des gepulsten Lasers kann Triggersignale zu einem Controller übermitteln, der durch ein gegenüber den Triggerimpulsen zeitlich verschobenes Gatesignal die Messung des Fluores-

zenzlichtes auslöst. Besonders bevorzugt ist der gepulste Laser ein Diodenlaser, so daß gegenüber anderen Lasersystemen eine besonders kostengünstige Meßanordnung realisiert werden kann.

[0038] Die Anregungsmittel umfassen bevorzugt eine konfokale Optik zur Fokussierung des Anregungslichtstrahls auf der Oberfläche des Trägers.

[0039] Vorteilhaft umfassen die Detektionsmittel wenigstens einen lichtempfindlichen Sensor mit schneller Antwortzeit. Die Detektionsmittel können aber auch wenigstens zwei Sensoren umfassen, denen Mittel zur spektralen Zerlegung des Fluoreszenzlichtes vorgeschaltet sind. Bevorzugt sind bei einer spektralen Auswertung des Fluoreszenzlichtes mehrere Sensoren vorgesehen, beispielsweise ein zeilenartig angeordnetes Diodenarray oder ein Zeilen-CCD-Chip. Besonders bevorzugt ist der Sensor eine Photodiode, insbesondere eine Lawinen-Photodiode, ein Phototransistor oder ein Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier).

[0040] Vorzugsweise umfassen die Detektionsmittel eine konfokale Optik zur Abbildung von aus dem Meßbereich emittierten Fluoreszenzlicht auf den Sensor, so daß lediglich Fluoreszenzlicht aus einer schmalen Schicht der Trägeroberfläche auf den Detektor fällt. Die konfokale Optik kann beispielsweise in einem Epifluoreszenzmikroskop integriert sein oder es wird zumindest ein Mikroskopobjektiv zur Abbildung verwendet.

[0041] Falls man den Träger, also beispielsweise den Biochip stationär hält, wird vorzugsweise der Anregungslichtstrahl abgelenkt. Dazu können als Steuerungsmittel bewegliche Spiegel, beispielsweise sog. Laserscan-Spiegel oder akustooptische Deflektoren verwendet werden. Im Fall einer stationären Optik wird der Träger in einer zur Chipoberfläche parallelen Ebene verschoben. Dazu können unterschiedlichste Betätigungseinrichtungen, die eine präzise reproduzierbare zweidimensionale Verschiebung des Trägers erlauben, herangezogen werden. Beispielsweise kann der Träger auf einem xy-Kreuztisch angeordnet sein, der durch Schrittmotoren bewegt werden kann. Die Steuerung der Schrittmotoren kann über einen Computer erfolgen. Die Position des Anregungslichtstrahls kann bei bekannter Schrittweite durch elektronisches Zählen der Einzelschritte des Motor bestimmt werden. Bei bekannter Verschiebegeschwindigkeit von Träger und Anregungsstrahl gegeneinander, kann die Meßdauer in eine Ortsbestimmung umgerechnet werden. Um eine Akkumulation von Einzelfehlern im Laufe einer Messung zu verhindern, können auf dem Träger Markierungen zur optischen Kontrolle der Absolutposition des Trägers vorgesehen sein. Vorteilhaft ist auch eine Einrichtung zur automatischen Fokussierung des Anregungslichtes vorgesehen. Die immobilisierten Substanzen sind bevorzugt in einem zweidimensionalen Muster (einem sog. Array) auf dem Träger angeordnet.

[0042] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Auswertung von Biochips. Die Biochips weisen an einer planaren Trägeroberfläche immobilisierte Substanzen auf, wobei diese immobilisierten Substanzen an der Oberfläche fixierte biologische Sonden und/oder an die Sonden gebundene Proben sein können. Dabei können die Sonden, die Proben oder die Sonden und die Proben fluoreszenzmarkiert sein. Als Trägermaterial können folgende Stoffe verwendet werden: Glas (Standardglas, Pyrexglas, Quarzglas), Kunststoffe hoher Reinheit bzw. geringer Eigenfluoreszenz (wie Polyolefine, PE, PP, Polymethylpenten, Polystyrol, PMMA, Polycarbonat, Teflon), Metalle (wie Gold, Chrom, Kupfer, Titan, Silizium), oxidische Materialien bzw. Beschichtungen (Keramiken, aluminiumdotiertes Zinkoxid (TCO), Silica, Aluminiumoxid), Membranen (wie Polysaccharide, Polycarbonat,

Nation), dreidimensionale Strukturen (etwa Gele z. B. Polyacrylamid, Agarose, Keramiken) oder auch Formteile aus obigen Materialien wie Mikrotiterplatten, Röhrchen und Dipsticks. Für eine bessere Haftung, die Reduzierung unspezifischer Bindung oder für eine kovalente Ankopplung der biochemischen oder biologischen Sonden kann das Aufbringen einer Zwischenschicht oder eine Voraktivierung der Oberfläche notwendig sein, z. B. durch Silane (Alkylsilane, Epoxysilane, Aminosilane, Carboxysilane), Polymere (Polysaccharide, Polyethylenglycol, Polystyrol, polyfluorierte Kohlenwasserstoffe, Polyolefine, Polypeptide), Alkylthiole, derivatisierte Alkylthiole, Lipide, Lipid-Doppelschichten oder Langmuir-Blodgett Membranen. Das Aufbringen der Sonden auf die Oberfläche erfolgt durch Pipettieren, Dispensieren, Drucken, Stempeln oder in situ Synthese (z. B. photolithographische Techniken). Es werden bevorzugt verschiedene Sonden in einem zweidimensionalen Muster auf die Oberfläche aufgebracht. Jeder Sonde kann dann eine eindeutige Position auf der Oberfläche zugeordnet werden. Die Ankopplung der biochemisch oder biologischen Sonden kann kovalent, adsorptiv oder über physikalisch/chemische Wechselwirkungen der Sonden mit der Oberfläche erfolgen. Es können alle bekannten Techniken eingesetzt werden. Als Sonden werden bevorzugt verwendet: Nukleinsäuren und Oligonukleinsäuren (einzeln- und/oder doppelsträngige DNA, RNA, PNA, LNA in Reinform oder auch in Kombinationen), Antikörper (humane, tierische, polyklonale, monoklonale, rekombinante, FAB-Fragmente, synthetische), Proteine (etwa Allergene, Inhibitoren, Rezeptoren), Enzyme (etwa Peroxidasen, Alkalische-Phosphatasen, Glukose-Oxidase, Nukleasen), kleine Moleküle (Haptene): Pestizide, Hormone, Antibiotika, Pharmaka, Farbstoffe, synthetische Rezeptoren oder Rezeptorliganden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den Sonden um Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotide.

[0043] Darüber hinaus eignet sich die erfindungsgemäße Vorrichtung für vielfältige Aufgaben in der Qualitätskontrolle. Aufgrund des konfokalen Meßprinzips eignet sich die Vorrichtung beispielsweise zur Auswahl einer geeigneten Oberfläche mit geringer Eigenfluoreszenz, zur Kontrolle der Reinheit der Oberfläche oder zur Kontrolle der Oberflächenrauigkeit, wobei die Auflösung im wesentlichen dem Durchmesser des Laserfokus entspricht. Ferner können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die unterschiedliche Anregungs- und/oder Emissionswellenlänge und/oder ein anderes Abklingverhalten aufweisen.

[0044] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden unter Bezugnahme auf in den beigefügten Zeichnungen dargestellte Ausführungsbeispiele ausführlicher beschrieben. In den Zeichnungen zeigt:

[0045] Fig. 1 einen schematischen Aufbau eines erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanners für Biochips;

[0046] Fig. 2 den zeitlichen Verlauf von zwei aufeinanderfolgenden Anregungslichtimpulsen und des durch den ersten Anregungslichtimpuls erzeugten Fluoreszenzsignals;

[0047] Fig. 3 ein Ablaufschema des erfindungsgemäßen Verfahrens;

[0048] Fig. 4 ein Diagramm zur Hintergrundfluoreszenz verschiedener Trägermaterialien;

[0049] Fig. 5 ein Diagramm zur Fluoreszenz oberhalb, auf und unterhalb der Oberfläche eines Trägermaterials;

[0050] Fig. 6 ein Diagramm zum Fluoreszenzprofil eines mit Goldspots beschichteten Glsträgers;

[0051] Fig. 7 eine Auswertung von Hybridisierungsexperimenten auf einem DNA-Chip unter stringenten Bedingungen;

[0052] Fig. 8 eine hochaufgelöste Fluoreszenzmessung eines DNA-Chips;

[0053] Fig. 9 eine Auswertung von Hybridisierungsexperimenten auf einem DNA-Chip unter weniger stringenten Bedingungen;

[0054] Fig. 10 ein Diagramm zum dynamischen Meßbereich und zur Linearität des erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanners; und

[0055] Fig. 11 ein Diagramm zur Nachweisgrenze des erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanners bei Hybridisierungsmessungen von DNA-Chips.

[0056] In Fig. 1 ist als eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf der Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen ein Fluoreszenzscanner 10 dargestellt.

[0057] Der Fluoreszenzscanner 10 weist einen mit einer Frequenz f von 50 MHz gepulsten Diodenlaser 11 auf, der einen Anregungslichtstrahl 12 aussendet, welcher über einen dichroitischen Strahlteiler 13 und ein Mikroskopobjektiv 14 auf die Oberfläche eines Biochips 15 fokussiert wird. Im Anregungsstrahlengang 12 ist ein Raumfilter 16 angeordnet. Der Raumfilter 16 besteht aus einer Sammellinse 17, die das im wesentlichen parallele Licht des Diodenlasers 11 auf ein Pinhole 18 fokussiert. Das aus dem Pinhole 18 austretende divergente Lichtbündel wird durch die Sammellinse 19 wieder in einen parallelen Lichtstrahl mit sehr geringer Divergenz umgewandelt. Auf dem Biochip 15 befinden sich fluoreszenzmarkierte Sonden, die durch den Lichtstrahl 12 angeregt werden. Das von den Fluoreszenzsonden emittierte Fluoreszenzlicht wird wiederum durch das Mikroskopobjektiv 14 gesammelt und zu einem Emissionslichtstrahl 20 gebündelt. Die Strahlengänge des Anregungs- und des Fluoreszenzlichts werden am dichroitischen Strahlteiler 13 geteilt. Während das vom Laser kommende kurzwelligere Anregungslicht 12 am Strahlteiler 13 im wesentlichen reflektiert wird, transmittiert der Strahlteiler 13 das vom Träger 15 ausgehende langwelligere Fluoreszenzlicht 20. Dadurch ist es möglich, dasselbe Mikroskopobjektiv 14 sowohl für das Anregungslicht als auch für das Fluoreszenzlicht zu verwenden. Das Fluoreszenzlicht 20 durchläuft einen als Langpaß oder als auf die Fluoreszenzwellenlänge abgestimmten Bandpaß ausgebildeten Emissionsfilter 21, der reflektierte oder gestreute Anteile des Anregungslichtes 12 herausfiltert. Über einen Spiegel 22 wird das emittierte Fluoreszenzlicht 20 zu einer Sammellinse 23 geleitet, die den Strahl auf ein als konfokale Blende ausgebildetes Pinhole 24 fokussiert. Unmittelbar nach dem Pinhole 24 ist ein Detektor 25 angeordnet, beispielsweise ein Single-Photon Avalanche Detektor. Der Detektor 25 wandelt das gemessene Fluoreszenzlicht in ein elektrisches Signal um, das über eine Leitung 26 zu einem Korrelator 27, etwa einem Single Photon Counter und Boxcar-Averager, übertragen wird, der zeitkorreliertes Zählen einzelner Photonen ermöglicht. Die Zeitkorrelation des gemessenen Fluoreszenzsignals erfolgt über eine Triggerleitung 28, über welche der Diodenlaser 11 mit jedem emittierten Laserpuls ein Triggersignal an den Korrelator 27 sendet. Das Fluoreszenzsignal wird mit einer Zeitauflösung von 350 ps erfaßt und über eine Datenleitung 29 an einen Computer 30 übermittelt und dort gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls graphisch dargestellt.

[0058] Der Biochip 15 ist auf einem xy-Verschiebetisch 31 angeordnet, der von Schrittmotoren 32 angetrieben wird. Die Steuerung der Schrittmotoren 32 erfolgt über eine Leitung 33 durch den Computer 30. Der Verschiebetisch 31 ist sowohl in der Zeichenebene der Fig. 1 in der durch den Doppelpfeil angedeuteten Richtung, als auch in einer zur Zeichenebene senkrechten Richtung verschiebbar.

[0059] In Fig. 2 ist das Prinzip der zeitkorrelierten Fluoreszenzdetektion näher erläutert. Dargestellt ist der zeitliche

Verlauf der Intensität von zwei Anregungslaserpulsen L und dem durch den ersten der beiden Pulse hervorgerufenen Fluoreszenzsignal in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, au). Der Übersichtlichkeit halber sind die Intensitäten der Laserpulse und des Fluoreszenzlichtes unterschiedlich skaliert, so daß sie im Diagramm ungefähr gleiche absolute Höhe besitzen. Die horizontale Zeitskala ist in Fig. 2 in Nanosekunden (ns) dargestellt.

[0060] Man erkennt zwei aufeinanderfolgende Laserpulse L des von dem Diodenlaser 11 der Fig. 1 emittierten Anregungslichtes. Bei einer Pulsfrequenz f von 50 MHz folgen die Anregungspulse einander im Abstand von $1/f = 20$ ns. Zwischen den Anregungspulsen L wird während eines Meßintervalls Δt_m von ca. 10 bis 15 ns Fluoreszenzlicht detektiert. Die Pulsdauer des Lasers liegt bei weniger als einer Nanosekunde, während die im dargestellten Beispiel eingesetzte Fluoreszenzsonde Rodamin eine Fluoreszenzlebensdauer von 3,2 ns besitzt. Mit der Anstiegsflanke des Laserpulses wird ein Triggersignal ausgesandt. Wird das Fluoreszenzsignal erst nach einer Verzögerung Δt von 1 bis 2 ns nach dem Triggersignal gemessen, so ist die Intensität des Anregungspulses bei Beginn der Fluoreszenzmessung weitgehend abgeklungen. Dadurch wird eine zeitliche Diskriminierung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht ermöglicht. Es können daher auch starke Reflexe, die vom Emissionsfilter 21 nicht vollständig ausgeblendet werden, oder auch ramanverschobenes Streulicht, welches den dichroitischen Strahlteiler 13 und den Emissionsfilter 21 passieren kann, vom eigentlich interessierenden Fluoreszenzsignal unterschieden werden. Wird zusätzlich zur zeitlichen Korrelation des Fluoreszenzsignals mit den einzelnen Anregungspulsen eine zeitaufgelöste Messung des Fluoreszenzsignals durchgeführt, so können aus dem Abklingverhalten des Fluoreszenzsignals weitere Informationen gewonnen werden. Werden beispielsweise zwei Sonden mit unterschiedlicher Fluoreszenzlebensdauer eingesetzt, so kann man aus dem Abklingverhalten Rückschlüsse auf die relativen Anteile der beiden Sonden ziehen.

[0061] In Fig. 3 ist ein prinzipielles Ablaufschema des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt. Zunächst wird der Chip 15 mit Hilfe des xy-Verschiebetisches 31 so positioniert, daß der Anregungslaserstrahl 12 auf den ersten Meßpunkt fokussiert ist (vergl. Fig. 1). Ein erster Laserpuls ($i = 1$) mit einer Pulsbreite von weniger als einer Nanosekunde regt die im Fokus des Anregungslichtstrahls befindlichen Fluoreszenzsonden zu Emission von Fluoreszenzlicht an, das nach einer Verzögerung Δt von ca. 2 ns nach dem Laserpuls während eines Meßintervalls Δt_m von ca. 15 ns zeitaufgelöst detektiert wird. Pro Meßpunkt der Chipoberfläche wird eine bestimmte Anzahl i_{\max} Einzelmessungen durchgeführt. Bei einer Pulsrepetitionrate des Lasers von 50 MHz können beispielsweise $i_{\max} = 5000$ Einzelmessungen pro Meßpunkt innerhalb von 100 μ s durchgeführt werden. Die i_{\max} zwischen zwei Anregungspulsen gemessenen Fluoreszenzsignale werden dann zur Verbesserung des Signal-/Rauschverhältnisses aufintegriert und gemittelt. Wenn die vorgegebene Zahl von Einzelmessungen an einem Meßpunkt erreicht ist, kann der Verschiebetisch 31 um ein bestimmtes Inkrement Δx und/oder Δy (beispielsweise 1 μ m) bewegt werden, so daß sich der Fokus des Anregungslaserstrahls nun an einer anderen Stelle auf der Oberfläche des Biochips befindet. Dieser Zyklus wird solange wiederholt bis der gewünschte zweidimensionale Bereich des Biochips abgetastet ist.

[0062] Es ist aber auch möglich, die i_{\max} Einzelmessungen durchzuführen, während der Verschiebetische kontinuierlich bewegt wird. Δx und/oder Δy entsprechen dann der erreichbaren Auflösungen. Beispielsweise kann – mit den ob-

gen Zahlenwerten zu Pulsfrequenz und Anzahl der aufzuintegrierenden Einzelmessungen – bei einer Abtastgeschwindigkeit von 10 mm/s eine Auflösung von 1 µm realisiert werden.

Beispiele

1. Qualitätskontrolle

Hintergrundbestimmung und Reinheitskontrolle

[0063] Für die empfindliche Messung von Biochips ist es vorteilhaft, wenn das Trägermaterial eine möglichst geringe Eigenfluoreszenz an der Oberfläche aufweist. Mit dem erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanner, wie er im Zusammenhang mit Fig. 1 näher beschrieben wurde, läßt sich die Beschaffenheit von Trägeroberflächen sehr gut kontrollieren. In Fig. 4 sind die mit dem erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanner gemessenen Hintergrundsignale verschiedener Materialien dargestellt. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzintensität bezogen auf Glas (= 1.00). Materialien, deren Eigenfluoreszenz in der Größenordnung von Glas oder darunter liegt, sind als Träger für Biochips besonders geeignet. [0064] Ein Vorteil des konfokalen Meßprinzips des erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanners ist es, daß nur das Fluoreszenzlicht eines kleinen Raumausschnittes (beispielsweise mit einer Tiefe von 10–20 µm) detektiert wird. Dies ermöglicht es, in transparenten Materialien ein Tiefenprofil der Fluoreszenz aufzunehmen bzw. das Material dreidimensional zu durchleuchten. Auf diese Weise läßt sich genau nachvollziehen, ob die gemessenen Fluoreszenzsignale aus dem Trägermaterial selbst stammen oder ob es sich um Verunreinigungen auf der Oberfläche handelt. In Fig. 5 sind Messungen der Fluoreszenzintensität I (in willkürlichen Einheiten) aus drei Bereichen (Luft L, Oberfläche O und dem Inneren I des Materials) dargestellt. Die Verunreinigungen auf der Oberfläche sind deutlich zu erkennen. Diese sind nicht photostabil und bleichen bei andauernder Belichtung aus.

2. Messung von reflektierenden Oberflächen

[0065] Für viele Anwendungen (beispielsweise Oligo-SAMs auf Gold oder elektrisch adressierbare Biochips) werden metallische Trägermaterialien wie z. B. Gold benötigt. Die Messung auf diesen Oberflächen ist bei vielen Scannern nicht oder nur durch ein aufwendiges Filtersystem möglich, da glatte Metalloberflächen das Anregungslicht reflektieren und so sehr hohe Hintergrundsignale erzeugt werden. Bei Messungen mit dem erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanner ist es durch zeitdiskriminierte Messungen möglich, diese Hintergrundsignale zeitlich auszublenden. Damit können hochempfindliche Fluoreszenzmessungen auf Metalloberflächen bei sehr niedrigem Hintergrund durchgeführt werden. In Fig. 6 ist die mit einem erfindungsgemäßen Scanner gemessene Fluoreszenz (in willkürlichen Einheiten) einer Pyrex-Glasoberfläche dargestellt, auf die 100 µm große Goldquadrate aufgebracht wurden. Wird die Oberfläche direkt gemessen (Grenzschicht Gold/Luft bzw. Glas/Luft), zeigen die Gold beschichteten Stellen ein niedrigeres Signal als das umgebende Glas.

3. Hybridisierungsexperimente

3.1 200 µm Spots

[0066] Vier 13-mer Capture-Sonden aus dem Ki-ras Gen mit Wildtyp und 3 verschiedenen Mutationen in Kodon 12

und 13 (Gly 12 wt AGC TGG TGG CGT A; Asp 12 AGC TGA TGG CGT A; Asp 13 TGG TGA CGT AGG C; Val 12 AGC TGT TGG CGT A; Mutationen unterstrichen) wurden jeweils als 200 µm Spots an Oberflächen gekoppelt. Nach stringenter Hybridisierung einer 24mer Cy5 Probe mit einer zu Asp 12 komplementären Sequenz (60 min bei 37°C in 6 × SSPE Puffer mit 0.1% Tween 20) wurde die Oberfläche stringent gewaschen (2 × SSPE Puffer mit 0.1% Tween 20). Nach Scannen der Oberfläche mit dem erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanner wurde die Diskriminierung zwischen Perfect Match (Val 12) und Mismatches ausgewertet. Das Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 3 Einzelmessungen) ist in Fig. 7 dargestellt

3.2 Messung ohne Waschschrift

[0067] Mit den Chips aus dem Beispiel 3.1. wurde eine Messung direkt nach einer Stunde Hybridisierung mit 40 µL 10 pM 24mer-Cy5-Sonde, ohne weitere Waschräume oder Wechsel der Hybridisierungslösung durchgeführt. Durch das konfokale Meßprinzip ist eine effektive Ausblendung der Moleküle in Lösung möglich. Der Anstieg des Backgrounds ist < 1%. Ab einer Cy5 Sondenkonzentration von 10⁻¹¹ M ist kein Anstieg des Backgrounds mehr zu erkennen.

3.3 10 µm Spots

[0068] Auch sehr kleine Spots lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanner detektieren und räumlich auflösen. In Fig. 8 ist die Fluoreszenzintensität entlang einer Linie (Breite 1 Pixel = 1 µm) durch ein Array eines 18-mer-Oligos (Sequenz des Perfect Matches (PM): 5'TATT-CAGGCTGGGGGCTG-3') nach Hybridisierung mit einer 55-mer-Cy5-Sonde dargestellt. Die Spots haben einen Durchmesser von ca. 10 µm und einen Mittenabstand von 50 µm. An den steilen Flanken in Fig. 8 ist die sehr gute Auflösung des Scanners bei Verwendung eines 100x/1.25 Öbobjektivs zu sehen. Die optische Auflösung ist im dargestellten Beispiel besser als 3 µm (90%/10%).

3.4 SH-modifizierte Oligonukleotide auf Goldoberflächen

[0069] Eine Glasoberfläche wurde mit 100 µm großen Quadraten aus Gold beschichtet. Drei Regionen der Oberfläche wurden mit 3 verschiedenen SH-modifizierten 18-meren (Sequenz des Perfect Matches (PM): 5'TATT-CAGGCTGGGGGCTG-3') derivatisiert. Es wurde mit einer Cy5-Sonde hybridisiert und niedrig stringent gewaschen (0.2 × SSCT). In Fig. 9 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 5 Einzelmessungen für Perfect Match (PM), ein Mismatch (1 MM) und 2 Mismatches (2 MM) dargestellt. Die relativ starken Schwankungen der Meßwerte wurden in diesem Beispiel durch eine inhomogene Derivatisierung der Goldoberfläche verursacht.

4. Dynamischer Bereich

[0070] Für die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Fluoreszenzmessungen ist die Dynamik und Linearität des Meßbereiches von entscheidender Bedeutung. Bei der Messung von Biochips mit immobilisierten Reagenzien wird der Meßbereich durch drei Parameter bestimmt: (1) der unteren Nachweisgrenze des Gerätes, (2) dem Meßbereich des Gerätes und (3) der maximale Bindungskapazität der einzelnen Reagenzienspots. Um den Meßbereich des Gesamtsystems zu testen wurde ein DNA-Chip hergestellt, bei dem eine maximale Belegung der Spotoberflächen mit einem 18-mer

Oligo gewährleistet war. Der Spotdurchmesser betrug ca. 200 µm. Dieser Chip wurde mit steigenden Konzentrationen an Cy5-markiertem Oligo hybridisiert und nach einem Waschschrift vermessen. Das Ergebnis ist in Fig. 10 dargestellt. Die Detektionseinheit hat einen dynamischen Bereich von 4 Größenordnungen. Dieser kann durch das Zwischenschalten von Abschwächungsfiltern (Meßwerte "Filter 1" und "Filter 2" in Fig. 10) erweitert werden, bis schließlich die maximale Sättigung des Spots erreicht ist. Anstelle des Einsatzes von Filtern kann man den Meßbereich aber auch elektronisch erweitern, beispielsweise durch Abschwächen der Empfindlichkeit des Detektors. Das Gesamtsystem (Detektor und Biochip) verfügt somit über einen Meßbereich von ca. 4-5 Größenordnungen. Eine Linearität über 3 bis 4 Größenordnungen ist dabei je nach Filterwahl sichergestellt. Die Standardabweichung der Messung liegt innerhalb der dargestellten Meßpunkte (der Variationskoeffizient liegt zwischen 1 und 6% bei jeweils 3 Einzelmessungen). Mit "Blank" ist in Fig. 10 eine Vergleichsmessung ohne hybridisierte Fluoreszenzprobe bezeichnet.

5. Empfindlichkeit

[0071] Die Nachweisgrenze des Gesamtsystems (Scanner und Hybridisierung) wurde mit einem Biochip bestimmt, auf dem ein 18-mer Oligo in 10 µm Spots aufgetragen war. Es wurde mit steigenden Konzentrationen einer Cy5-Probe hybridisiert. 2 µL der Probenlösung wurden auf den Chip aufpipettiert und 1 h inkubiert. Aus den in Fig. 11 dargestellten Resultaten (BG ist Intensität des Hintergrundsignals) ergibt sich eine Nachweisgrenze für dieses Testformat von ca. 10^{-18} mol absolut. Damit liegt die erreichbare untere Nachweisgrenze des erfindungsgemäßen Fluoreszenzscanners Fall unterhalb von 10^{-18} mol.

Patentansprüche

1. Verfahren zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen, wobei man
 - (a) einen Anregungslichtstrahl in Form einer Serie von kurzen Lichtimpulsen auf einen Meßbereich mit definierter Größe auf der Oberfläche des Trägers einstrahlt und jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtimpulsen Fluoreszenzlicht detektiert, das von in dem Meßbereich befindlichen immobilisierten Substanzen ausgestrahlt wird,
 - (b) den Anregungslichtstrahl und den Träger relativ zueinander bewegt,
 und man die Schritte (a) und (b) solange wiederholt bis ein bestimmtes Areal der Oberfläche des Trägers abgetastet ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das Fluoreszenzlicht zeitaufgelöst detektiert.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Fluoreszenzlicht durch zeitkorreliertes Zählen einzelner Photonen registriert.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man das Fluoreszenzlicht konfokal detektiert.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man das Fluoreszenzlicht wellenlängenabhängig detektiert.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man den Anregungslichtstrahl konfokal auf die Oberfläche des Trägers fokus-

siert.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der durch den Anregungslichtstrahl definierte Meßbereich auf der Oberfläche des Trägers einen Durchmesser von 1 bis 20 µm (FWHM) aufweist.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Träger verwendet, auf dem die immobilisierten Substanzen in Form eines zweidimensionalen Musters angeordnet sind, wobei man im Schritt (b) den Anregungslichtstrahl und/oder den Träger so zueinander bewegt, daß die Elemente des zweidimensionalen Musters sequentiell abgetastet werden.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oberfläche des Trägers durch Ablenken des Anregungslichtstrahls abtastet.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oberfläche des Trägers durch Verschieben des Trägers in einer zu der Oberfläche parallelen Ebene abtastet.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man Anregungslicht einer definierten Wellenlänge einstrahlt.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man Anregungslicht mit mehreren definierten Wellenlängen einstrahlt.

13. Vorrichtung zum orts aufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen, mit Anregungsmitteln zum Einstrahlen eines Anregungslichtstrahls in Form einer Serie von kurzen Lichtimpulsen auf einen definierten Meßbereich auf der Oberfläche des Trägers,

Detektionsmitteln zum zeitaufgelösten Detektieren von aus dem Meßbereich emittiertem Fluoreszenzlicht zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtimpulsen, Mitteln zur zeitlichen Korrelation der Anregungs- und Detektionsmittel, und

Steuerungsmittel zur Steuerung der Relativposition von Anregungsstrahl und Träger.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungsmittel wenigstens einen gepulsten Laser umfassen.

15. Vorrichtung gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der gepulste Laser ein Diodenlaser ist.

16. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungsmittel eine konfokale Optik zur Fokussierung des Anregungslichtstrahls auf der Oberfläche des Trägers umfassen.

17. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionsmittel wenigstens einen lichtempfindlichen Sensor mit schneller Antwortzeit umfassen.

18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionsmittel wenigstens zwei Sensoren umfassen, denen Mittel zur spektralen Zerlegung des Fluoreszenzlichtes vorgeschaltet sind.

19. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 13 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Sensor eine Photodiode, insbesondere eine Lawinen-Photodiode, ein Phototransistor oder ein Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier) ist.

20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionsmittel eine konfokale Optik zur Abbildung von aus dem Meßbereich emittiertem Fluoreszenzlicht auf dem Sensor um-

fassen.

21. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Steuerungsmittel bewegliche Spiegel und/oder akustooptische Deflektoren zur Ablenkung des Anregungslichtstrahls umfassen. 5

22. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Steuerungsmittel eine Betätigungseinrichtung zur zweidimensionalen Verschiebung des Trägers umfassen. 10

23. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einrichtung zur automatischen Fokussierung des Anregungslichtstrahls vorgesehen ist.

24. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierten Substanzen in einem zweidimensionalen Muster auf dem Träger angeordnet sind. 15

25. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 24 zur Auswertung von Biochips, welche an einer planaren Trägeroberfläche immobilisierte Substanzen aufweisen, wobei die immobilisierten Substanzen fixierte biologische Sonden und/oder an die Sonden gebundene Proben sind. 20

26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Sonden um Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotide handelt. 25

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierten Substanzen fluoreszenzmarkiert sind. 30

28. Verwendung gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß man wenigstens zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarker verwendet, die sich in Fluoreszenzwellenlänge und/oder Fluoreszenzabklingkonstante unterscheiden. 35

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

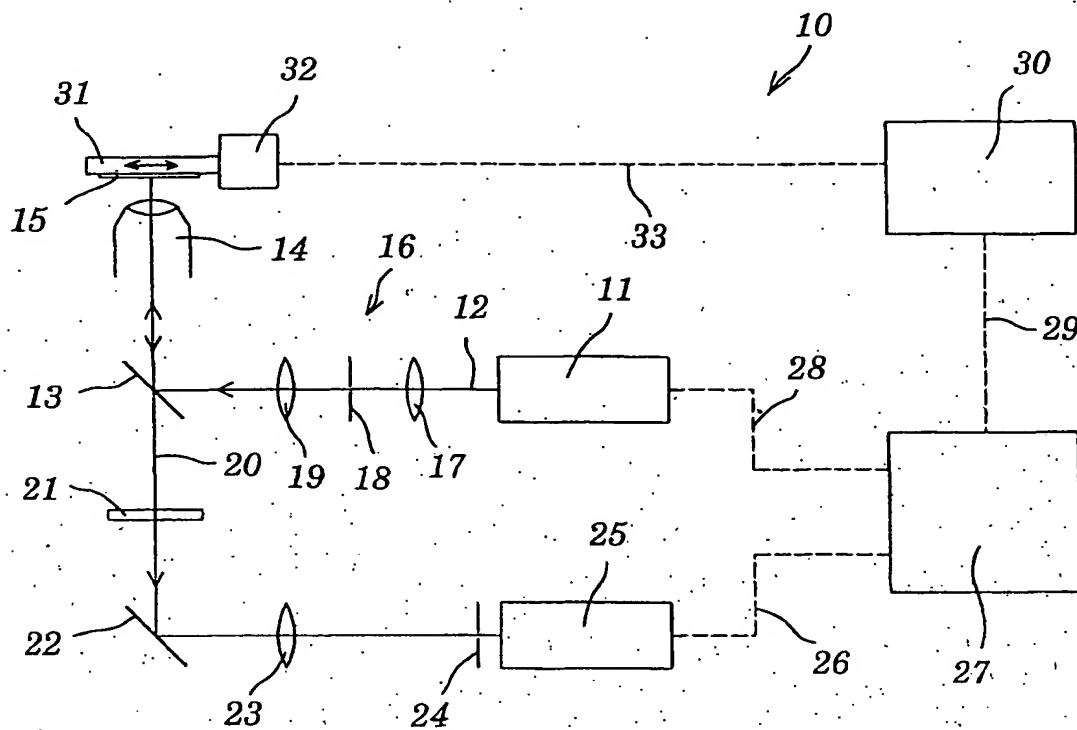


Fig. 1

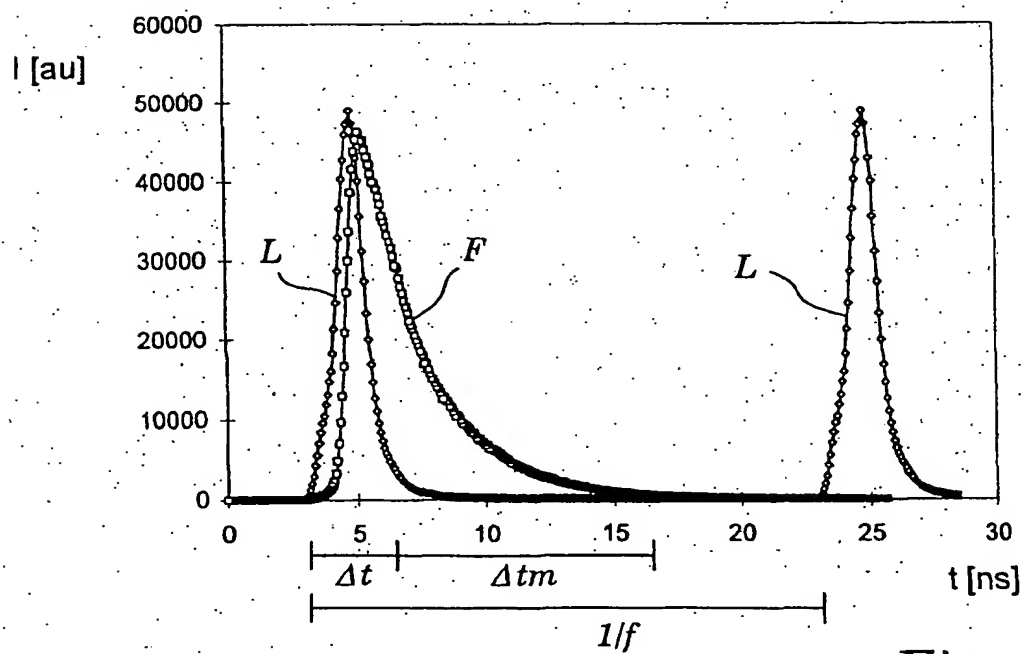


Fig. 2

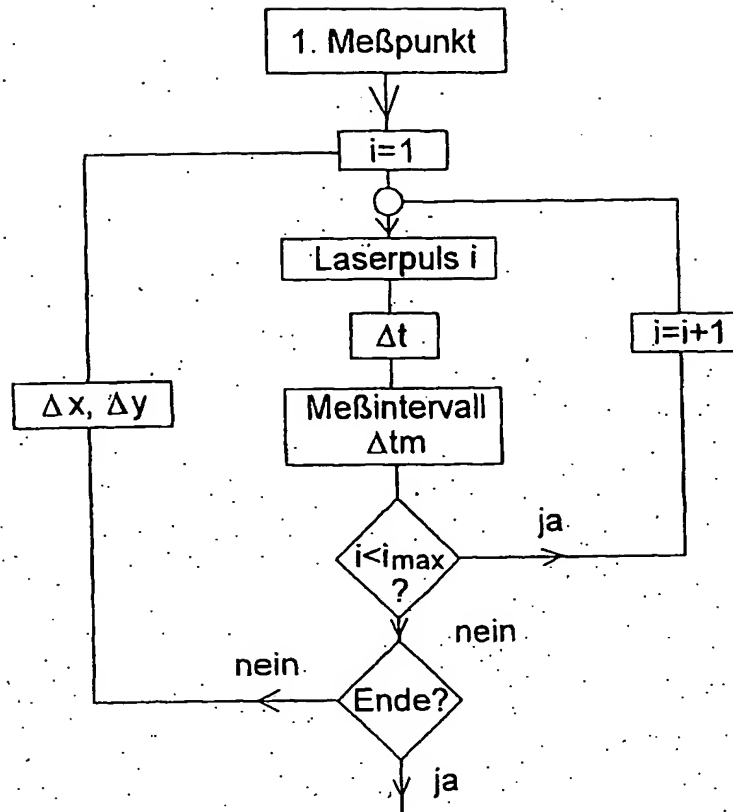


Fig. 3

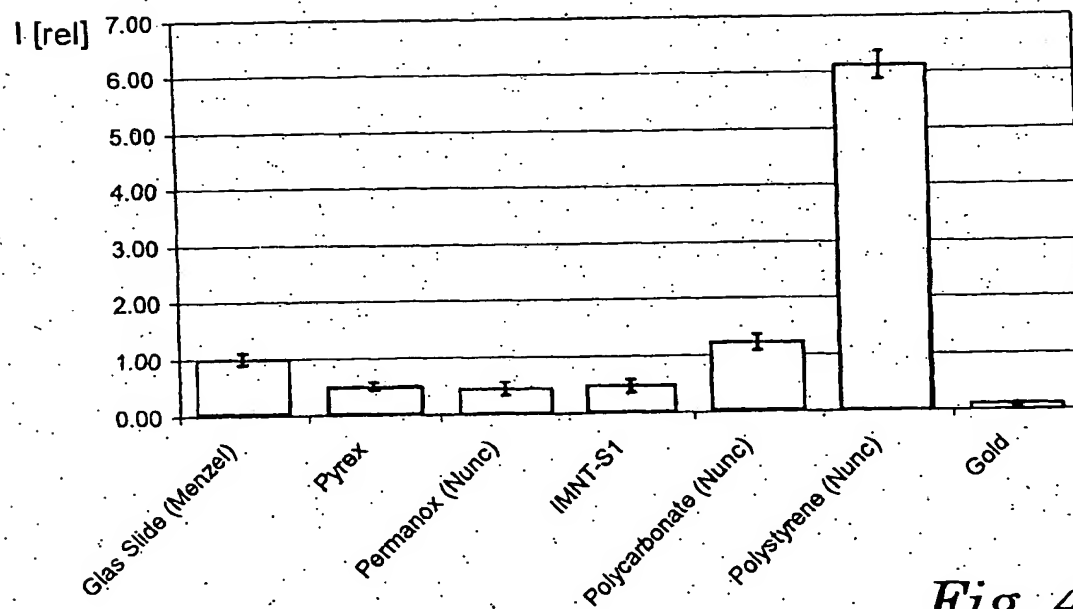


Fig. 4

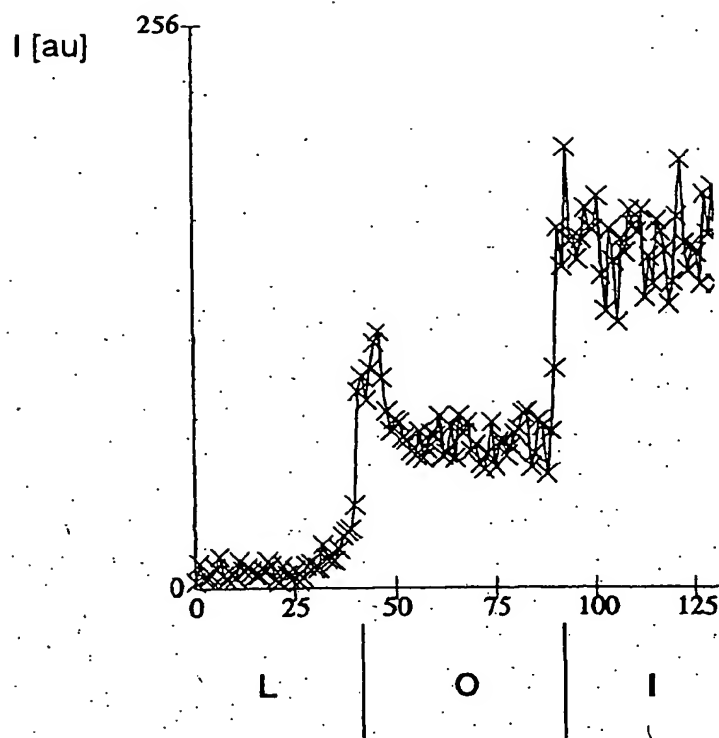


Fig. 5

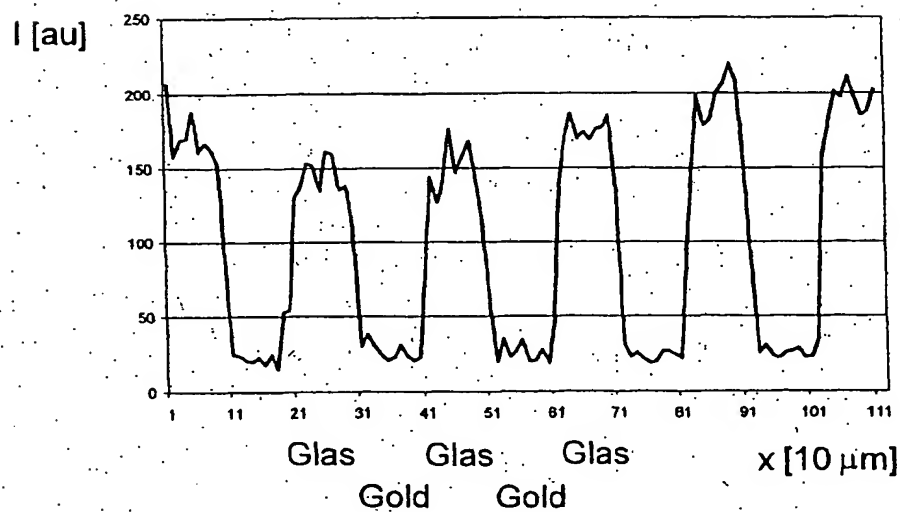


Fig. 6

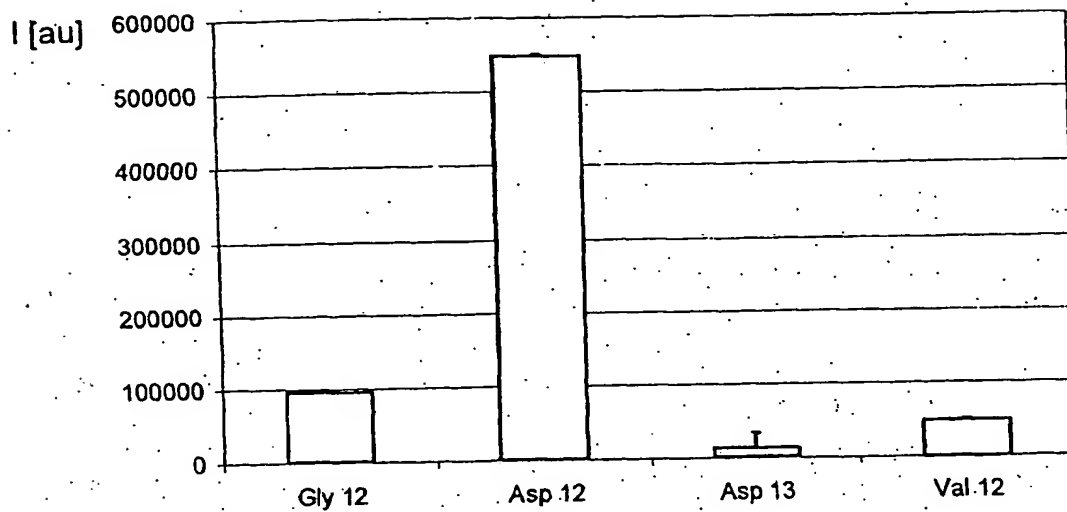


Fig. 7

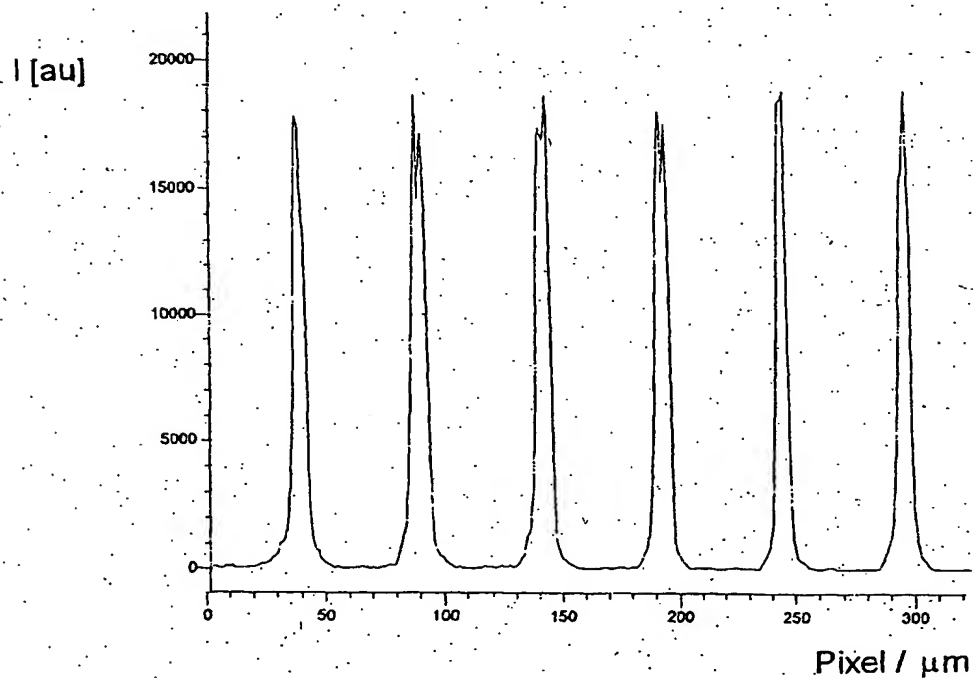


Fig. 8

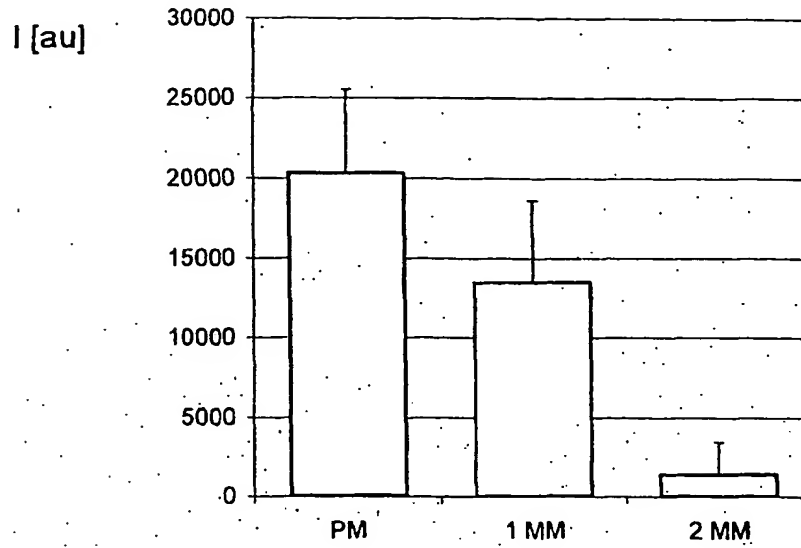


Fig. 9

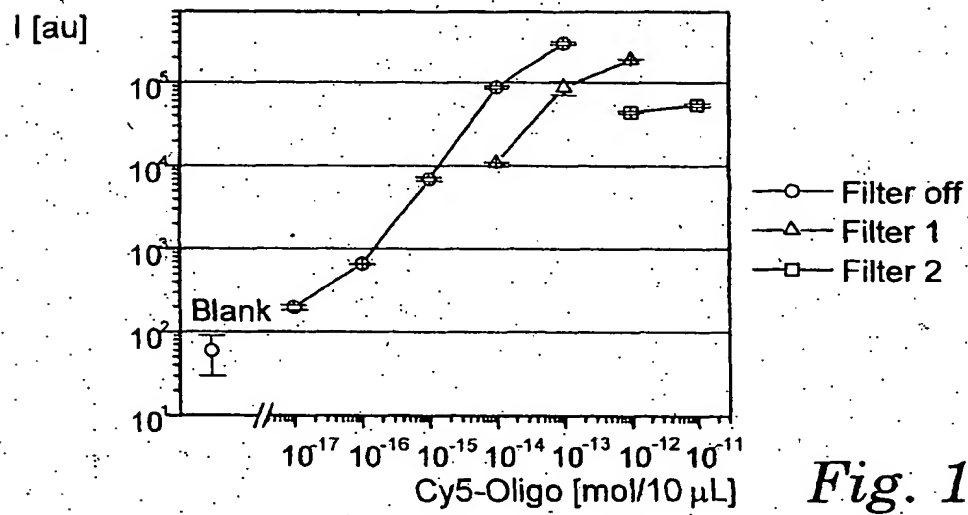


Fig. 10

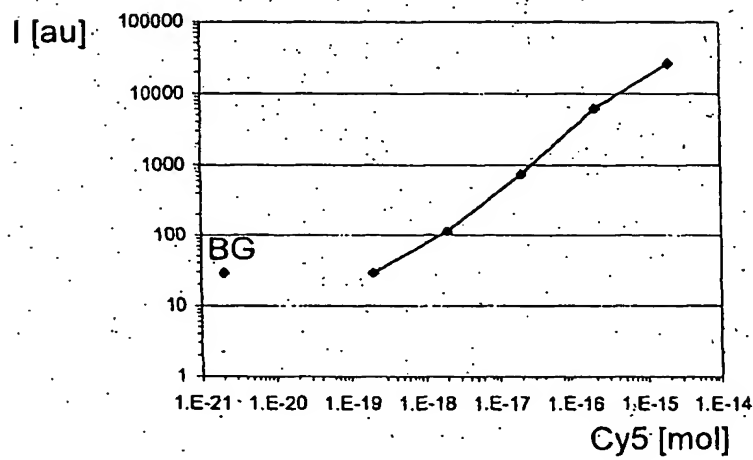


Fig. 11